



EESTI VABARIIK



RIIGI PATENDIAMET  
The Estonian Patent Office

SEP 17 2001

TECH CENTER 1600/2900

## TÖEND Certificate

Taotluse nr  
Application No

199900072

Käesolevaga tõendatakse, et lisatud ärakiri on Riigi Patendiametile esitatud taotluse algdokumentide tõene ärakiri.

This is to certify that the copy annexed hereto is a true copy from the documents of application as originally filed with the Estonian Patent Office.

Tallinn

23 -03- 2001

Osakonnajuhataja  
Head of Department

Patendiamet tõendab, et  
The Estonian Patent Office certifies that

Asper OÜ

esitas patentitaotluse nr  
filed a patent application No

P199900072

leiutisele  
entitled

Meetod ja seade biopolümeermaatriksi lugemiseks ja analüüsiks

Patendiametile  
with the Estonian Patent Office on

21.04.1999

Rahvusvahelise patentklassifikatsiooni indeks  
International Class

G01N 21/64

Tallinn, 23.03.2001

Elle Mardo  
Patendiosakonna juhataja  
Head of Patent Department



## Meetod ja seade biopolümeermaatriksi lugemiseks ja analüüsiks

### TEHNIKA VALDKOND

5 Käesolev leiutis kuulub molekulaarbioloogia, molekulaardiagnostika ja laseroptika valdkonda. Täpsemalt käsitleb leiutis meetodit fluorescentsmarkeritega märgistatud biopolümeerimolekulide paralleelseks detekteerimiseks ja analüüsiks kahemõõtmelisel maatriksil, kasutades täielikku sisepeegeldusfluoresentsi ning fluoresentsdetektorit selle meetodi kasutamiseks.

10

### TEHNIKA TASE

Eelnevalt valmistatud lühikesete biopolümeeride (nukleiinhapete, peptiidide vm) keemilisel sidumisel tahkele läbipaistvale alusele (klaasile) kahemõõtmelise struktuurina on võimalik 15 taolist maatriksstruktuuri kasutada diagnostilistel eesmärkidel, näiteks liites (hübridiseerides) maatriksina seotud DNA ahelatele uuritava nukleiinhappe lõigu. Uuritav materjal võib olla eelnevalt fluorofooridega märgistatud, märgise lülitumine võib aga toimuda ka vahetult enne analüüsi. Nukleiinhappemaatriksi lugemiseks ja analüüsiks kasutatakse mitmesuguseid erinevatel füüsikalistel printsipiidel põhinevaid aparaate, milliseid on võimalik jagada 20 põhiliselt kahte kategooriasse, esiteks detektorid ja teiseks konfokaalmikroskoopial põhinevad skannerid.

Käesolevas leiutises esitatud seadme, täielikul sisepeegeldusfluoresentsil põhineva fluorescentsdetektori lähim lahendus on firma "Vysis Inc., " (Downers Grove, IL, USA) poolt 25 valmistatud CCD kaamerale põhinev instrument "GenoSensor™".

CCD kaamerale põhinev instrument "GenoSensor™" töötab järgmiselt. Klaasalusele seotud 30 DNA proovidega hübridiseerunud fluorescentsmärgisega analüüsitarvivate molekulide detekteerimiseks ergastatakse DNA maatriksit läbivas valguses (joonis fig. 1) ksenoonlambiga, filtriides vastava filtriga koguvalgusest välja fluorofooride ergastamiseks vajamineva spektrijoone. Fluorofooride poolt emiteeritud valgus filtreeritakse vastava emissioon filtriga ja kogutakse optika abil kõrglahutusega jahutatava CCD kaamera poolt, mille järel saadud signaalid töödeldakse arvutis.

Nukleiinhappe maatriksi puhul on tegemist tahkele läbipaistvale alusele seotud suure tihedusega nukleiinhappemolekulide kahemõõtmelise (2D) struktuuriga. Maatriksil tehtud bioloogilise reaktsiooni tulemuse hindamisel on probleemiks detekteerimise nii madal tundlikkus ja selektiivsus (läbiva valguse kasutamine fluorokroomide ergastamiseks on 5 ebaefektiivne, koguvalgusest tuleb välja filtreerida vastava fluorofoori ergastamiseks vajaminev spektrijoon), kui ka detekteerimise kiirus (skaneerimine on reeglina aeganõudev). Kuna oligonukleotiidmaatriksil põhineva polümeraasi ekstensiooni (APEX, Arrayed Primer Extension) puhul kasutatakse nelja erineva fluorofooriga märgitud dideoksünukleotiidi (terminatorit) reaktsioonis üheaegselt, siis on vajalik taolise nukleiinhappemaatriksi 10 lugemiseks neljas spektrialas töötavat detektorit. Antud detektor peab võimaldama iga fluorofoori maksimaalselt efektiivse ergastamise ja signaalide jäädvustamise, milles on võimalik hiljem kokku panna terviklik analüüs tulemus.

#### LEIUTISE OLEMUS

15

Ülaltoodud probleemide lahendamiseks pakutakse käesolevas leiutises meetodit, milles kasutatakse täielikku sisepeegeldusfluorestsentsi (joonis fig. 2) biopolümeermaatriksi lugemiseks (näiteks nukleotiidide järjestuse määramiseks uuritavas DNA molekulis) ja sisepeegeldusfluorestsentsi kasutamisel põhinevat detektorit kui seadet, mis tagab 20 nukleiinhappemaatriksil tehtud reaktsioonide tulemuse kiire ja täpse hindamise kuni neljas erinevas valgusspektri alas.

Käesoleva leiutise eesmärk on pakkuda seade ja meetod biopolümeermaatriksil ehk *chipil* tehtud bioloogilise reaktsiooni tulemuse analüüsiks. Näiteks nukleiinhappemaatriksit saab 25 kasutada põhiliselt kahel viisil. Esimesel juhul, ainult hübridisatsionil põhineva analüüsi korral, hübridiseeritakse maatriksile immobiliseeritud geneetilise materjaliga analüüsitarv nukleiinhappe lõik, mis on varustatud sellesse amplifikatsionil sisestatud fluoresentsmärgistega. Kuna nii moodustuva kaheahelalise nukleiinhappe ahelas asuvate lämmastikaluste vaheliste vesiniksidemete energia on piiratud, siis ei ole selline, ainult 30 hübridisatsionil põhinev, reaktsioonimehhanism eriti selektiivne ja ei võimalda selget signaali eristamist mürast.

Teiseks võimaluseks on maatriksile seotud oligonukleotiidide ja analüüsitarv nukleiinhappe lõigu hübridisatsionile lisada ensümaatiline reaktsioon (näiteks polümeraasi ekstensiooni-

reaktsioon), mille puhul pikendatakse iga maatriksile seotud DNA lõiku ühe, fluoresentsmärgisega varustatud, nukleotiidi võrra ensüümi DNA polümeraasi vastavalt uuritavas DNA-s asuvale geneetilisele informatsioonile.

- 5 Oligonukleotiidmaatriksil põhinev DNA ekstensioonireaktsioon DNA polümeraasiga kasutab substraadina fluorofooridega märgitud dideoksünukleotiide. Kuna reaktsioonisegus kasutatakse kõiki nelja fluoroforiga märgitud terminaatornukleotiidi üheaegselt, siis liidetakse immobiliseeritud oligonukleotiidile neljast konkureerivast nukleotiidist vaid üks, uuritava nukleiinhappe primaarstruktuurile vastav nukleotiid.

10

Kasutatav ensümaatiline mehhanism annab ainult hübridisatsioonil põhineva reaktsiooni ees järgmised eelised:

2. Kui maatriksile immobiliseeritud DNA ja uuritava nukleiinhappe vaheline hübridisatsioon (paardumine) ei ole perfektne, siis ensüüm antud struktuuri ära ei tunne ja ensümaatiline reaktsioon ei toimu.
3. Kui hübridisatsioon (paardumine) on perfektne, siis ensüüm liidab immobiliseeritud DNA-le terminaatornukleotiidi, sünteesides nende vahele keemilise sideme, mis on väga püsiv ja võimaldab peale bioloogilise reaktsiooni toimumist maatriksit pesta ning sel teel vabaneda mittespetsiifiliselt seondunud bioloogilisest materialist. Sellega on võimalik saavutada tunduvalt parem signaali ja müra suhe, mis võimaldab antud testsüsteemi kasutada heterosügotsete mutatsioonide detekteerimiseks.

- 25 Käesolevas leiutises avatud meetodit kasutatakse biopolümeermaatriksi analüüsiks, juhtides maatriksi aluse (klaasi) otsast sisse kindla lainepikkusega valguskiir (laserikiir) nurga all, mis kutsub esile selle valguse täieliku sisepeegelduse, nii et maatriks muutub valguslaine kandjaks, nagu on kujutatud joonisel fig. 2. Teatav osa valgusest ei peegeldu klaasi sisepinnalt vaid tungib läbi klaasi pinna välja evanestsentse (sumbuva) lainena, mille intensiivsus, küll eksponentsialselt langedes, ulatub siiski umbes 1/4-ni valguse lainepikkusest. Antud kaugus klaasi pinnast on küllaldane, et ergastada vahetult maatriksi pinnal olevate nukleiinhappe-molekulide koosseisu lülitatud fluorofoorid. Kuna polümeraasi ekstensiooni puhul on tegemist nelja erineva nukleotiidi/fluoroforiga, siis kasutatakse nende ergastamiseks nelja erineva lainepikkusega laserit, et saavutada fluoresentsmärgiste maksimaalne ergastus. Emiteeritud valgus kogutakse läbi vastavate emissioonfiltrite, et vabaneda laseri foonvalgusest ja koondatakse optilise süsteemi (objektiivi) abil CCD kaamerasse. Kuna tegemist on jahutatud

CCD kaamerjal põhineva süsteemiga, siis on taoline fluoresentssignaalide detekteerimine kiire, vajades ühe nukleotiidi/fluoresentskanali jaoks 10 sekundit.

#### JOONISTE LÜHIKIRJELDUS

5

Alljärgnevalt käsitletakse leiutist viidetega joonistele, milles:

joonis fig. 1 kujutab biopolümeermaatriksi aluse pinnal asuvate fluorokroomide ergastamist läbiva valgusega,

10 joonis fig. 2 analoogilise aluse pinnal asuvate fluorokroomide ergastamine valguse täieliku sisepeegelduse abil vastavalt käesoleva leiutise meetodile,

joonis fig. 3 kujutab käesolevale leiutisele vastavat meetodit kasutavat teostusvarianti, kus laserikiire abil täieliku sisepeegeldusfluoresentsi saavutamiseks fokuseeritakse kiir silinderläätsel abil nii, et selle läbimõõt on väiksem aluse paksusest,

15 joonis fig. 4 kujutab käesolevale leiutisele vastavat teostusvarianti, kus laserikiire alusesse juhtimiseks kasutatakse optilist prismat ning prisma ja aluse vahel asuvat läbipaistvat vedelikku, mille murdumisnäitaja on lähedane aluse ja prisma omadele,

joonis fig. 5 kujutab leiutisele vastavat fluorescentsdetektori põhimõtteskeemi.

20

Joonised fig. 2 kuni fig. 4 illustreerivad käesolevas leiutises kasutatavat meetodit biopolümeermaatriksite lugemiseks. Õhukesele paralleelsele seintega läbipaistvast materjalist alusele (1) on seotud fluoresceeruvalt märgitud biopolümeerimolekulid. Fluoresceeruvate molekulide ergastamiseks parima efektiivsusega kasutatakse laserikiirt (2). Silinderläätsel (3)

25 abil fokuseeritakse laserikiir aluse (1) paksusest väiksema läbimõõduga lehvikuks ning juhitakse alusesse (1) selle otspinna kaudu, kusjuures kiir juhitakse alusesse (1) sellise nurga all, et aluses tekib kiire täielik sisepeegeldumine. Laserikiire abil saavutatud fluorescents juhitakse optiliselt valgustundlikku elementi, mis võimaldab saada alusele (1) seotud ning laserikiire poolt ergastatud fluoresceeruvate molekulide kujutisi. Eelnevalt kirjeldatud 30 mehhaniomi abil saavutatud fluorescents projietseeritakse optiliselt valgustundlikku kaamerasse, mis võimaldab saada alusele (1) seotud ning laserikiire poolt ergastatud fluoresceeruvate molekulide kujutisi, nagu on kujutatud joonisel fig. 5. Laserikiir juhitakse alusesse (1) selle otspinna kaudu. Valgustundliku elemendina kasutatakse digitaalselt juhitavat CCD kaamerat (7). Laserikiirt skaneeritakse tasapinnalise läbipaistvast materjalist plaadi või

tahuka abil (4) ning samaaegselt moduleeritakse optilise kiilu (5) abil. Nende elementide koostoimel muutub peegli (6) abil biopolümeermaatriksi alusesse (1) juhitava laserikiire sisenemisnurk.

- 5 Valguskiire juhtimiseks alusesse (1) külgpinnalt kasutatakse prismat (8), nagu on kujutatud joonisel fig. 4. Peegelduskadude vähendamiseks valguse üleminekul prismast (8) alusesse (1) kasutatakse prisma (8) ja aluse (1) vahel läbipaistvat vedelikku (9), näiteks mikroskoopias kasutatavat immersioonöli, mille murdumisnäitaja on lähedane aluse (1) ja prisma (8) murdumisnäitajale.

10

Kuigi leiutist on kirjeldatud seoses sellega, mida praegu peetakse kõige praktilisemaks eelistatud teostuseks, peaks olema mõistetav, et leiutis pole piiratud kirjeldatud teostusega, vaid vastupidi, ta on mõeldud hõlmama mitmesuguseid modifikatsioone ja ekvivalentseid seadmeid, mis sisalduvad juurdelisatud patendinöndluse idees ja ülatuses.

**Patendinõudlus**

1. Meetod biopolümeermaatriksi lugemiseks ja analüüsiks, **mida iseloomustab** see, et maatriksi alusesse juhitakse kindla lainepeikkusega valguskiir nurga all nii, et aluses tekitatakse valguse täielik sisepeegeldumine ning maatriks muudetakse valguslaine kandjaks, kusjuures teatav osa valgusest tungib läbi aluse pinna välja evanestsentse lainena, ergastades vahetult maatriksi pinnal olevaid biopolümeerimolekulide koosseisus olevaid fluorofoore.
- 5 2. Meetod vastavalt punktile 1, **mida iseloomustab** see, et valguskiirena kasutatakse laserikiirt.
- 10 3. Fluorestentsdetektor punktides 1 või 2 toodud meetodi kasutamiseks, mis koosneb digitaalselt juhitavast CCD kaamerast (7), selektiivse läbilaskvusega valgusfiltritest ja valgustustustsooni laiendamiseks kasutatavast hajutavast silinderläätsest (3).
- 15 4. Fluorestentsdetektor vastavalt punktile 3, **mida iseloomustab** see, et valgustsooni laiendamine biopolümeermaatriksi aluses saavutatakse laserikiire skaneeriva liikumisega, kusjuures laserikiire skaneerimine on saavutatud tasapinnalise läbipaistvast materjalist plaadi või tahuka (4) abil, mille pööramisel muutub laserikiire sisenemisnurk alusesse (1).
- 20 5. Fluorestentsdetektor vastavalt punktile 3 või 4, **mida iseloomustab** see, et laserikiire aluses (1) ühtlasema jaotumise saavutamiseks kasutatakse moduleerivat elementi.
- 25 6. Fluorestentsdetektor vastavalt punktile 5, **mida iseloomustab** see, et moduleeriva elemendina kasutatakse ümber oma telje pöörlevat optilist kiili (5), kusjuures optilise kiili telg asub laserikiire optilise telje lähedal.
- 30 7. Fluorestentsdetektor vastavalt ükskõik millisele punktile 3 kuni 6, **mida iseloomustab** see, et laserikiire alusesse (1) juhtimiseks kasutatava aluse külg- ja/või otspind on töödeldud matiks (valgust hajutavaks) saavutamaks laserikiire ühtlasemat jaotumist aluses.
8. Fluorestentsdetektor vastavalt ükskõik millisele punktile 3 kuni 7, **mida iseloomustab** see, et laserikiire alusesse (1) juhtimiseks kasutatava aluse külg- ja/või otspind on poleeritud saavutamáks laserikiire suuremat intensiivsust aluses.

9. Fluorestentsdetektor vastavalt ükskõik millisele punktile 3 kuni 8, **mida iseloomustab** see, et laserikiire juhtimiseks biopolümeermaatriksi alusesse (1) kasutatakse aluse pinnale kantud difraktsioonvõret.
- 5 10. Fluorestentsdetektor vastavalt ükskõik millisele punktile 3 kuni 9, **mida iseloomustab** see, et laserikiire juhtimiseks biopolümeermaatriksi alusesse (1) läbi aluse külginna kasutatakse optilist prisma (8).
- 10 11. Fluorestentsdetektor vastavalt punktile 10, **mida iseloomustab** see, et aluse (1) ja prisma vahel on läbipaistev vedelik (9), näiteks immersioonöli, mille murdumisnäitaja on lähedane aluse (1) ja prisma (8) murdumisnäitajale.

## Kokkuvõte

Täieliku sisepeegeldusfluoresentsi kasutamine biopolümeermaatriksi lugemiseks ja analüüsiks kuulub molekulaarbioloogia, molekulaardiagnostika ja laseroptika valdkonda ning

5 on mõeldud fluorescentsmarkeritega märgistatud biopolümeerimolekulide paralleelseks detekteerimiseks ja analüüsiks kahemõõtmelisel maatriksil. Maatriksil tehtud bioloogilise reaktsiooni tulemuse hindamisel on probleemiks nii detekteerimise madal tundlikkus, selektiivsus ja detekteerimise kiirus. Ülaltoodud probleemide lahendamiseks pakume täieliku sisepeegeldusfluoresentsi kasutamist kui meetodit ja sisepeegeldusfluoresentsi kasutamisel

10 põhinevat detektorit kui seadet biopolümeermaatriksi lugemiseks. Analüüsiks kasutame maatriksi alusesse kindla nurga all juhitud valguskiirt, mis kutsub esile selle valguse täieliku sisepeegelduse maatriksi aluses. Teatav osa valgusest ei peegeldu klaasi sisepinnalt vaid tungib läbi klaasi pinna välja evanestsentse lainena ja ergastab vahetult maatriksi pinnal olevate biopolümeerimolekulide koosseisu lülitatud fluorofoore. Saavutatud fluoressents

15 juhitakse valgustundlikku elementi, mis võimaldab saada informatsiooni maatriksi alusele seotud fluoresceeruvatest molekulidest. Taoline fluoresentsignaalide detekteerimine on kiire, vajades ühe fluoresentskanali jaoks umbes 10 sekundit.

21-04-1999

1/2

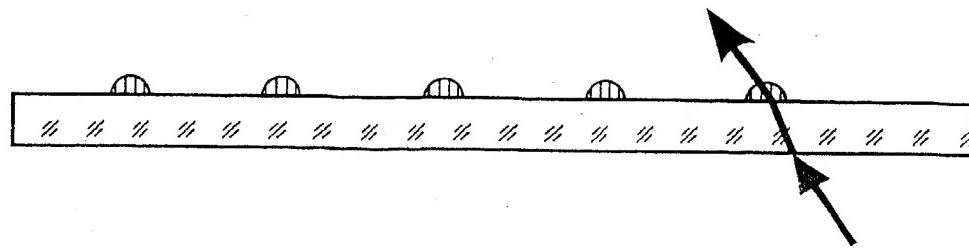


FIG 1

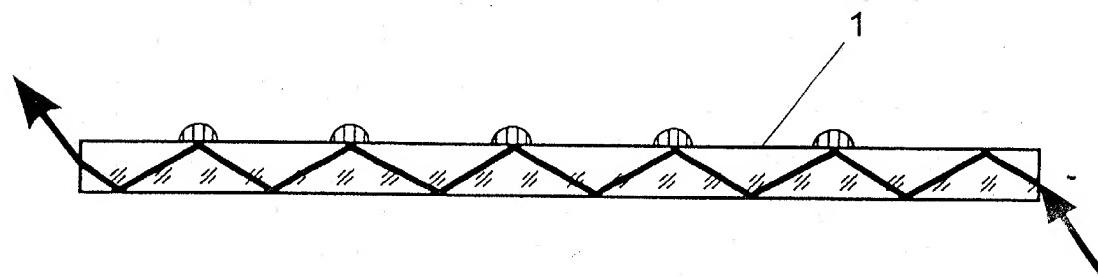


FIG 2

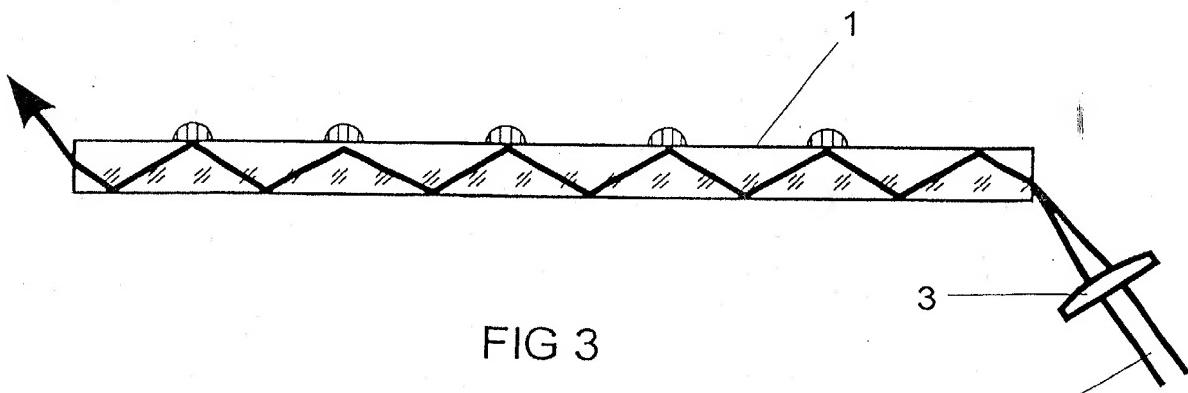


FIG 3

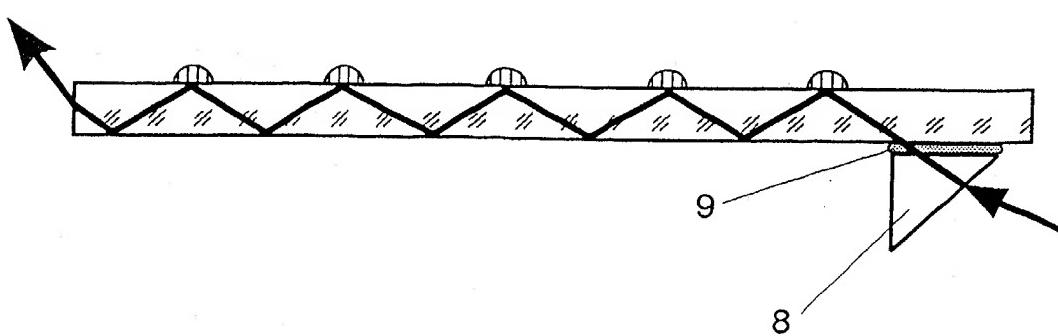


FIG 4

21-04-1999

2/2

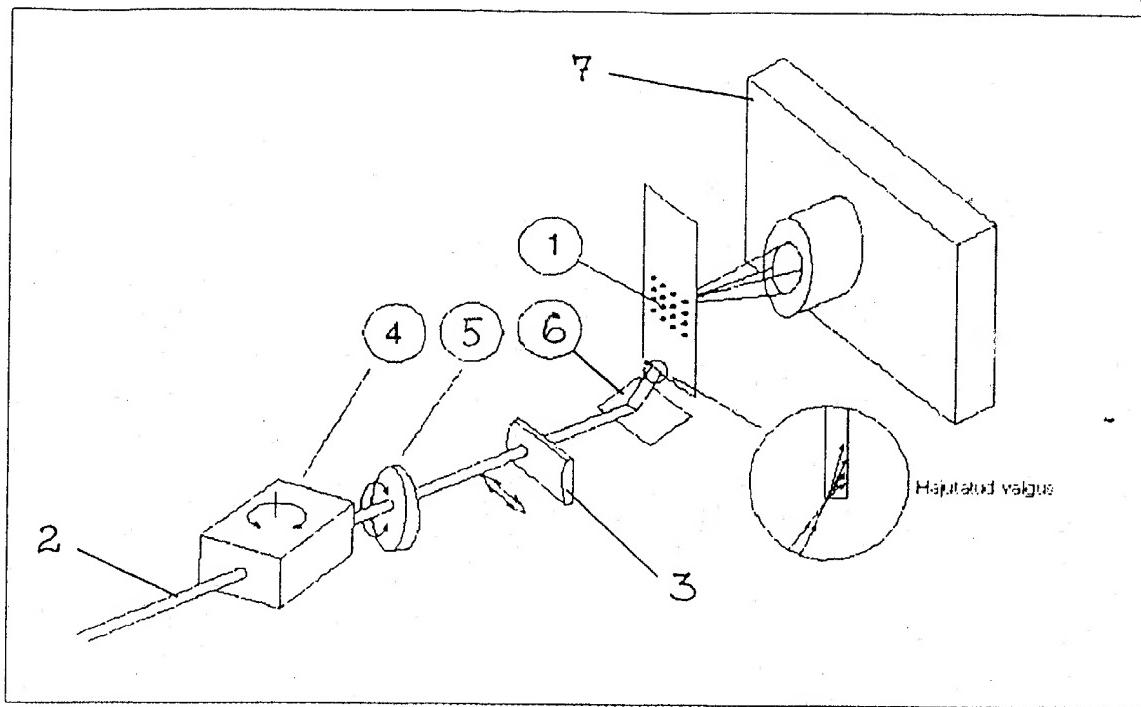


FIG 5